

10. E. Carriero, J. Galli, G. Fadda, S. Di Girolamo, F. Ottaviani, G. Paludetti. "Preliminary experiences with contact endoscopy of the larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 2000;257:68-71.
11. M. Kawaida, H. Fukuda, N. Kohno. "Video-assisted endoscopic laryngosurgery using a direct laryngoscope and a long rigid endoscope." Diagnostic and Therapeutic Endoscopy, Vol. 6, pp. 51-57, 2000.
12. C. Sarafoleanu. "Rolul endoscopiei de contact in diagnosticul leziunilor premaligne ale laringelui" – Revista romana de ORL, Vol. XXIX, Numar 1, 2007.
13. C. Sarafoleanu. "Endoscopia rigidă de contact asociată cu chirurgia microscopică laringiană" - Otorinolaringologia, Vol XXIII, Nr.3-4, 23-26, 2001.
14. V. Zainea, R. Călărașu, R. Hainaroșie, "Analiza critică a tehnicii videoendoscopiei de contact. Al 13-lea congres național de ORL și chirurgie cervico-facială". Timișoara, 2006, p. 102.
15. Wardrop PJC, Sim S, McLaren K. "Contact endoscopy of the larynx: a quantitative study. J Laryngol Otol 2000;114:437-40.
16. H. Xiaoming, M. Haiqiang, D. Manquan et al., "Examination of nasopharyngeal epithelium with contact endoscopy," Acta Oto-Laryngologica, vol. 121, no. 1, pp. 98-102, 2001.

## STANDARDIZAREA SUBSTANȚEI FARMACEUTICE ȘI COMPRIMATELOR CU BISULFAT DE COPTIZINĂ

**Igor Casian – dr. în farmacie, conferențiar cercetător,**

**Ana Casian – dr. în farmacie,**

**Vladimir Valica – dr. hab. în farmacie, profesor universitar**

**Centrul Științific în Domeniul Medicamentului, USMF "Nicolae Testemițanu"**

*Tel. 069680132 e-mail: Kasyan\_a@yahoo.com.*

### Rezumat

În lucrare au fost evaluate proprietățile fizico-chimice ale substanței farmaceutice Bisulfat de coptizină, obținute din părți aeriene de rostopască. Substanța prezintă o pulbere cristalină de culoare galben-portocalie, este puțin solubilă în apă, foarte puțin solubilă în etanol și alți solvenți organici polari, practic insolubilă în solvenți nepolari. Pentru standardizarea substanței active și a formei farmaceutice "Comprimate cu bisulfat de coptizină 10 mg" au fost elaborate metode cromatografice de identificare și dozare a substanței active și impurităților înrudite, metode spectrofotometrice pentru testele de dizolvare și uniformitatea unităților dozate, precum și metoda alternativă de dozare prin spectrofotometrie. Analiza prin metoda HPLC-UV s-a efectuat pe coloana Extrasil C-6, utilizând faza mobilă: acetonitril - soluție acid trifluoracetic 0,05% (35:65). Detecția s-a efectuat la lungimea de undă 358 nm pentru dozare și, la 280 nm pentru determinarea impurităților înrudite.

**Cuvinte-cheie:** Standardizarea, Bisulfat de coptizină, HPLC, Spectrofotometrie

### Summary. Standardization of the pharmaceutical substance and tablets with coptisine bisulphate

In this work have been evaluated the physicochemical properties of a pharmaceutical substance Coptisine bisulphate, obtained from Greater celandine herb. The substance represents a crystalline powder of yellow-orange color, low soluble in water, very low soluble in ethanol and other polar organic solvents, practically insoluble in non-polar solvents.

For standardization of the active substance and a pharmaceutical form "Coptisine bisulphate, tablets 10 mg" have been developed chromatographic methods for identification and assay of active substance and impurities, spectrophotometric methods for dissolution test and uniformity of dosage units, as well as an alternative spectrophotometric method for the assay. HPLC-UV analysis has been performed on Extrasil C-6 column, using the mobile phase: acetonitrile - 0.05% trifluoroacetic acid (35:65). Detection has been performed at wavelength of 358 nm for the assay and 280 nm for impurities.

**Key words:** Standardization, Coptisine bisulphate, HPLC, Spectrophotometry

### Резюме: Стандартизация лекарственной субстанции и таблеток с бисульфатом коптизина

В данной работе исследованы физико-химические свойства лекарственной субстанции Коптизина бисульфат, полученной из надземных частей чистотела большого. Субстанция представляет кристаллический порошок желто-оранжевого цвета, мало растворима в воде, очень мало растворима в этаноле и других полярных органических растворителях, практически нерастворима в неполярных растворителях. Для стандартизации действующего вещества и лекарственной формы «Таблетки коптизина бисульфата 10 мг» были разработаны хроматографические методы идентификации и количественного определения активной субстанции и посторонних

примесей, спектрофотометрические методы для тестов растворения и однородности дозированных единиц, а также альтернативный спектрофотометрический метод количественного определения. Анализ методом ВЭЖХ-УФ был выполнен на колонке Extrasil C-6 с использованием подвижной фазы: ацетонитрил - 0,05% раствор трифторуксусной кислоты (35:65). Детекция осуществлялась при длине волны 358 нм для количественного определения и 280 нм для определения посторонних примесей.

**Ключевые слова:** Стандартизация, Коптизина бисульфат, ВЭЖХ, Спектрофотометрия

## Introducere

Părțile aeriene de rostopască (*Chelidonium majus* L.) conțin un număr semnificativ de alcaloizi din diferite subgrupe chimice [1, 2, 3]. Unele efecte farmacologice ale alcaloizilor sunt atribuite derivaților benzfenantridinei, în special chelidoninei, fapt ce a fost luat de curând la baza standardizării produsului vegetal [4].

Rezultatele obținute în ultimii ani denotă faptul că alcaloidul principal în părțile aeriene de rostopască este coptizina și nu chelidonina [2, 3, 5, 6]. Totodată, apar tot mai multe surse bibliografice, în care se propune standardizarea produsului vegetal după coptizină [2, 6].

Elaborarea procedurii simplu și eficient de izolare a coptizinei în formă de bisulfat [7] poate avea un efect economic și social benefic. Această elaborare oferă posibilitatea de a înlocui bisulfatul de berberină, obținut dintr-o materie primă greu de reînnoit – rădăcini de drăcilă (*Berberis vulgaris* L.), cu substanța asemănătoare (bisulfat de coptizină), obținută din materie primă disponibilă și ieftină, cum este herba de rostopască.

## Obiectivele lucrării

Scopul studiului constă în evaluarea proprietăților fizico-chimice, elaborarea metodelor de standardizare a substanței bisulfat de coptizină, obținute din herba de rostopască și a forme farmaceutice “Comprimat cu bisulfat de coptizină 10 mg”.

## Material și metode

Substanța farmaceutică “bisulfat de coptizină” și substanța de referință “clorură de coptizină” au fost obținute conform procedurilor descrise recent [7] din părți aeriene de rostopască, recoltate din flora spontană în faza de înflorire. Comprimatele cu masa medie 100 mg, cu conținut de 10 mg bisulfat de coptizină (în recalcul la 100%), au fost obținute în condiții de laborator prin metoda de presare directă, utilizând în calitate de substanțe auxiliare lactoza monohidrat, amidon de cartofi, stearat de calciu, talc și celuloza microcristalină.

La efectuarea cercetărilor fizico-chimice au fost utilizate următoarele aparate de laborator: Cromatograf de lichide “Agilent 1260” cu detector UV-VIS cu șir de diode; spectrofotometru “Lambda 25” (Perkin Elmer); tester de dizolvare “Electrolab TDT-08”; tester de dezagregare tip ZT 122 (Erweka).

Reactivele, solvenții cu grad “pentru cromatografie” și substanțele de referință au fost procurate de la “Fluka” și “Sigma-Aldrich”.

Testele generale pentru substanțe farmaceutice și comprimate s-au efectuat conform prevederilor farmacopeei europene [8].

## Rezultate obținute și discuții

Substanța farmaceutică studiată, bisulfat de coptizină, după aspectul organoleptic, prezintă pulbere cristalină de culoare galben-portocalie până la portocalie închisă, fără miros, cu gust amar.

Bisulfatul de coptizină este puțin solubil în apă, foarte puțin solubil în alcool etilic și alți solvenți organici polari, practic insolubil în solvenți organici nepolari. În amestecuri de solvenți (de exemplu acetonitril – apă sau etanol – apă) solubilitatea crește considerabil.

La încălzire substanța se descompune treptat în intervalul aproximativ 280-350°C fără topire.

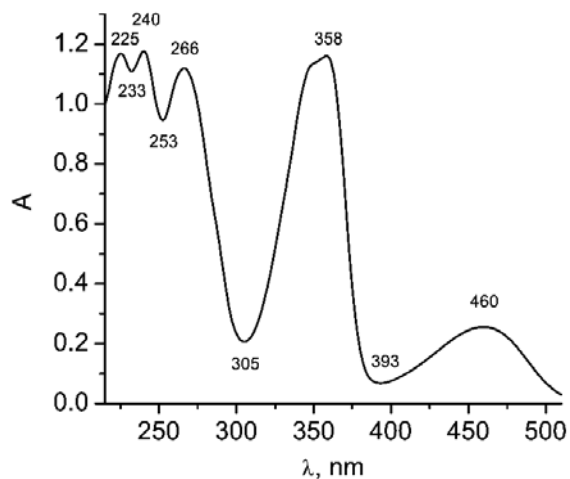


Fig. 1. Spectru UV a soluției bisulfat de coptizină 20 mg/l în fază mobilă

Pierderea în masă la uscare constituie până la 2,5%, iar reziduu prin calcinare – până la 15%. Valoarea majorată a ultimului parametru se explică prin conținutul de sulfați anorganici, izolați din materia primă.

Pentru identificarea bisulfatului de coptizină s-a propus depistarea indicilor caracteristici al spectrului UV-VIS de absorbție a soluției probă, preparate pentru testul de dozare (fig. 1), precum și compararea timpilor de retenție cromatografică a coptizinei din proba analizată și a soluției substanței de referință.

Identificarea substanței se mai poate efectua după reacția pozitivă la alcaloizi – cu acid picric (precipitat de culoare galbenă) și pentru ionul sulfat – cu clorura de bariu.

Ultima reacție a cerut includerea unor modificări în tehnica de lucru. La efectuarea acestui test prin metoda tradițională are loc precipitarea clorurii de coptizină, ce maschează formarea sulfatului de bariu. Pentru a preveni acest fenomen s-a propus înlăturarea coptizinei înaintea reacției de identificare prin adăugarea excesului de acid clorhidric și filtrarea sau centrifugarea probei. Adăugarea ulterioară a soluției clorură de bariu duce la formarea precipitatului sulfat de bariu, colorat în galben datorită cantităților reziduale ale ionilor de coptizină.

**Impuritățile înrudite chimice** în bisulfatul de coptizină sunt sulfatii anorganici, substanțele proteice, cantități neînsemnate de substanțe rășinoase și alcaloizii înrudiți caracteristici pentru planta rostopască. Deoarece ultima grupă de substanțe chimice posedă acțiuni farmacologice proprii, s-a propus includerea în documentația analitică a testului cantitativ pentru următorii alcaloizi înrudiți, care pot fi prezenți în substanța farmaceutică: chelidonina, sanguinarina, berberina și cheleritrina. Determinarea alcaloizilor înrudiți s-a efectuat prin metoda cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC).

Tehnica de preparare a probelor și condițiile cromatografice sunt identice celor utilizate pentru dozarea substanței active și a formei farmaceutice. Detec-

ția se realizează la 280 nm, lungime de undă la care diferiți alcaloizi de rostopască au valori de extincție apropiate. Aceasta ne-a permis estimarea rezultatelor ca raportul sumei suprafețelor tuturor picurilor de alcaloizi înrudiți la suprafața picului de coptizină, care nu trebuie să depășească 5%.

Înaintea efectuării testului se verifică selectivitatea sistemului cromatografic prin înregistrarea cromatogramelor soluției standard, preparată din substanțele de referință. Componentii se eluează din coloana cromatografică în următoarea succesiune: chelidonină (0,83); coptizină (1); sanguinarină (1,15); berberină (1,4); cheleritrină (1,7). În paranteze sunt date valorile aproximative ale retenției relative față de coptizină (fig. 2).

Pentru **dozarea coptizinei** atât în substanță, cât și în forma farmaceutică s-a elaborat următoarea tehnică de lucru HPLC-UV:

**Condițiile de analiză cromatografică.** Coloana cromatografică Extrasil C-6, 3  $\mu$ m, cu diametru intern 4-4,6 mm și lungimea 75-100 mm, sau analogică. Temperatura coloanei 30°C. Faza mobilă: amestec acetonitril - soluție acid trifluoracetic 0,05% (35:65). Viteza volumetrică a fazei mobile 1 ml/min. Detecția în UV la lungimea de undă 358 nm. Volumul probei de injectat 20  $\mu$ l.

**Soluția standard.** Circa 0,04 g substanță de referință clorură de coptizină se dizolvă în fază mobilă și se diluează până la concentrația circa 16 mg/l.

**Soluția probă.** Circa 0,05 g substanță bisulfat de

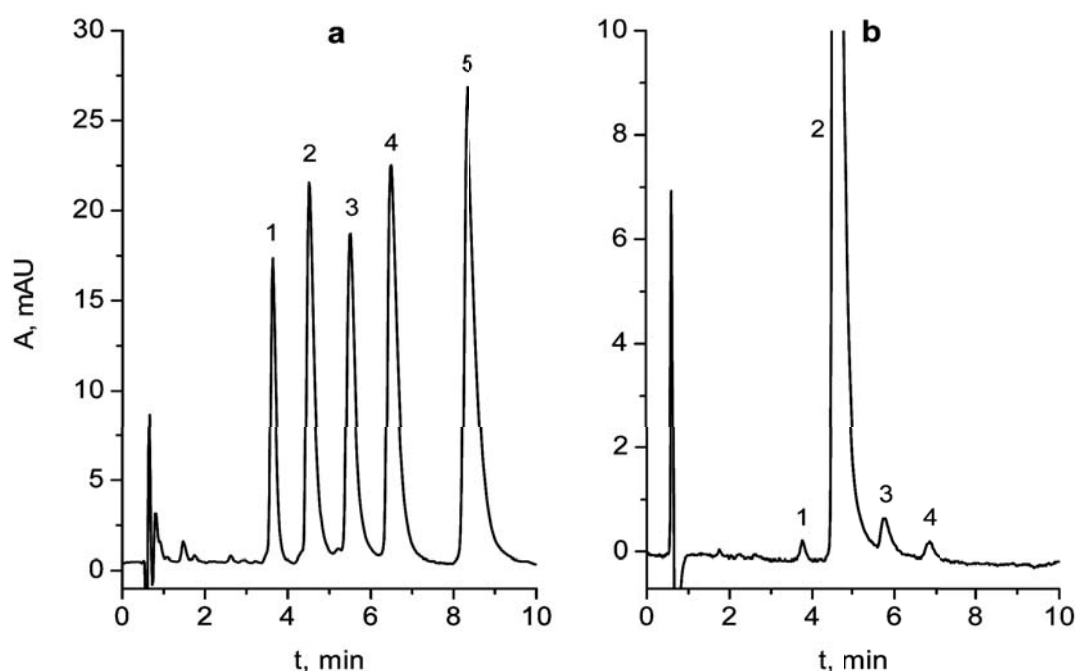


Fig. 2. Cromatogramele soluției standard (a) și a probei de analizat (b), obținute în testul pentru impurități înrudite:

1 – chelidonina; 2 – coptizina; 3 – sanguinarina; 4 – berberina; 5 – cheleritrina.

coptizina sau circa 0,5 g pulbere din comprimate triturate se tratează cu fază mobilă pe baia de ultrasunet, se completează volumul până la 50 ml, apoi, după filtrare, se diluează de 50 ori.

Conținutul bisulfatului de coptizină (în %) în substanța farmaceutică uscată se calculează conform formulei:  $X = \frac{S_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot 117.3}{S_{st} \cdot m_{pr} \cdot (100 - W_{pr})}$  Conținutul bisulfatului

de coptizină (în mg) într-un comprimat se calculează conform formulei:  $X = \frac{S_{pr} \cdot m_{st} \cdot \overline{m}_c \cdot C_{st} \cdot 11.73}{S_{st} \cdot m_{pr}}$ , unde:

$S_{pr}$  și  $S_{st}$  – valorile ariilor picului coptizinei pe cromatogramele probei de analizat și soluției standard, corespunzător;  $m_{pr}$  – masa substanței de analizat sau pulberii din comprimate, g;  $m_{st}$  – masa substanței de referință clorura de coptizină, g;  $W_{pr}$  – pierderea în masă prin uscare pentru substanța farmaceutică analizată, %;  $C_{st}$  – conținutul substanței de bază în substanța de referință clorură de coptizină, %;  $\overline{m}_c$  – masa medie a unui comprimat, g.

Limitele admisibile, stabilite pentru conținutul de bisulfat de coptizină sunt: cel puțin 80,0% în substanța farmaceutică și de la 9,25 mg până la 10,75 mg într-un comprimat.

În procedura de standardizare a formei farmaceutice cu bisulfat de coptizină s-au inclus și alți indici recomandați de Farmacopeea Europeană (*Ph. Eur.*) pentru comprimate:

**Masa medie** (0,100 g  $\pm 7,5\%$ ) și **uniformitatea masei** ( $\pm 7,5\%$  de la masa medie), s-a efectuat conform prevederilor *Ph. Eur.* 2.09.05.

**Testul de dezagregare** s-a efectuat la temperatura 36-37°C, utilizând în calitate de mediu apa purificată. Limita admisibilă este cel mult 15 min conform prevederilor *Ph. Eur.*, 2.9.1.

Pentru **testul de dizolvare** s-a propus următoarea tehnică de lucru: Aparatul II (cu palete) la viteza de rotație 100 min<sup>-1</sup>; mediul de dizolvare – apa purificată cu temperatura 37 $\pm$ 0,5°C, volumul – 500 ml. În fiecare din cele 6 vase cu mediu de dizolvare se plasează câte 1 comprimat. Timpul efectuării testului – 20 min. Analiza probelor se efectuează prin metoda spectrofotometrică.

**Soluția probă:** 5 ml probă filtrată se diluează până la 10 ml cu acetonitril.

**Soluția standard.** Circa 0,04 g substanță de referință clorură de coptizină se dizolvă în acetonitril 50% și se diluează până la concentrația circa 8 mg/l.

Absorbanța optică a soluției probă și soluției standard se măsoară la lungimea de undă 358 nm. În calitate de soluție de compensare se utilizează acetonitril 50%.

Cantitatea de coptizină (X, %), care a trecut în mediul de dizolvare, se calculează conform formulei:

$$X = \frac{A_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot 23.46}{A_{st}}, \text{ unde: } A_{pr} \text{ și } A_{st} - \text{absorbanța}$$

soluției probă și soluției standard, corespunzător;  $m_{st}$  – masa substanței de referință clorură de coptizină, g;  $C_{st}$  – conținutul substanței de bază în substanța de referință clorură de coptizină, %.

**Uniformitatea unităților dozate** se efectuează conform prevederilor *Ph. Eur.*, 2.9.40., aplicând metoda “Uniformitatea conținutului”. Pentru testul dat s-a propus următoarea tehnică de lucru:

Fiecare comprimat se amestecă cu 25 ml apă până la dezagregarea completă, utilizând la necesitate baia cu ultrasunet, apoi se adaugă 20 ml acetonitril, se tratează cu ultrasunet timp de 5 min și se completează volumul cu acetonitril până la 50 ml. Alicota filtrată se diluează de 25 ori cu acetonitril 50%. Se măsoară absorbanța probelor preparate din comprimate și a soluției standard, preparată pentru testul de dizolvare, la lungimea de undă 358 nm.

Conținutul de bisulfat de coptizină în fiecare comprimat (X), exprimat în % din doza nominală, se calculează conform formulei:

$$X = \frac{A_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot 29.33}{A_{st}},$$

unde:  $A_{pr}$  și  $A_{st}$  – absorbanța probei de analizat și a soluției standard, corespunzător;  $m_{st}$  – masa substanței de referință clorură de coptizină, luată în lucru, g;  $C_{st}$  – conținutul substanței de bază în substanța de referință clorură de coptizină, %.

Pentru forma farmaceutică s-a elaborat și o **metodă alternativă de dozare, prin spectrofotometrie**:

Circa 0,5 g pulbere din comprimate triturate se tratează cu acetonitril 50% pe baia de ultrasunet, se completează volumul până la 50 ml, apoi, după filtrare, se diluează de 100 ori cu același solvent. Absorbanța soluției probă și a soluției standard, preparate pentru testul de dizolvare, se măsoară la lungimea de undă 358 nm.

Cantitatea bisulfatului de coptizină într-un comprimat (X, mg) se calculează conform formulei:

$$X = \frac{A_{pr} \cdot m_{st} \cdot C_{st} \cdot \overline{m}_c \cdot 11.73}{A_{st} \cdot m_{pr}}, \text{ unde: } A_{pr} \text{ și } A_{st} - \text{absor-}$$

banța soluției probă și a soluției standard, corespunzător;  $m_{pr}$  – masa pulberii din comprimate, g;  $m_{st}$  – masa substanței de referință clorură de coptizină, g;  $C_{st}$  – conținutul substanței de bază în substanța de referință clorură de coptizină, %;  $\overline{m}_c$  – masa medie a unui comprimat, g.

### Concluzii

Au fost evaluate proprietățile fizico-chimice a substanței farmaceutice bisulfat de coptizină și ela-

borate metodele HPLC și spectrofotometrice pentru standardizarea acesteia. Standardizarea formei farmaceutice "Comprimat cu bisulfat de coptizină 10 mg" s-a efectuat după indicii "Identificare", "Dizolvare", "Dozare", "Uniformitatea dozării" și "Impurități înrudite".

Metodele elaborate, concomitent cu alți indici prevăzuți de Farmacopeea Europeană, pot fi incluse în documentația de normare a calității pentru substanța activă și forma farmaceutică.

#### Bibliografie

1. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). *Herba Chelidonii*. 2010, p. 73-89.
2. Diug, O. *Chelidonium majus* L. Sursă de noi forme farmaceutice. Teza de doctor, Chișinău, 2006.
3. Sarkozi, A., Janicsak, G., Kursinszki, L., Kery, A. *Alkaloid Composition of Chelidonium majus* L. Studied by

Different Chromatographic Techniques. *Chromatographia Supplement* 2006, 63, S81–S86.

4. *European Pharmacopoeia*, 7<sup>th</sup> edition, vol.1, Greater celandine (1861).

5. Kursinszki, L., Sarkozi, A., Kery, A., Szoke, E. *Improved RP-HPLC Method for Analysis of Isoquinoline Alkaloids in Extracts of Chelidonium majus*. *Chromatographia Supplement* 2006, 63, S131–S135.

6. Артамонова Е.С. *Современные подходы к стандартизации сырья и препаратов чистотела большого*. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы III Всероссийской конференции, кн. 2. Барнаул, 2007, стр. 267-270.

7. © Casian, I., Casian, A. *Izolarea coptizinei din herbă de rostopască (Chelidonium majus L.)*. Intellectus. 2013, vol. 1, p. 92-96.

8. *European Pharmacopoeia*, 7<sup>th</sup> edition, vol.1, Substances for pharmaceutical use (2034), Tablets (0478).